

L2 ANSWER 2 OF 2 CA COPYRIGHT 2004 ACS on STN
 AN 135:29830 CA
 TI Preparation of recombinant Bacillus subtilis cecropin LCI and its use as
 antibacterial agents in plant breedings as bacterial fertilizer
 IN Xu, Qing; Guo, Lihua; Chen, Zhangliang
 PA Beijing University, Peop. Rep. China
 SO Faming Zhuanli Shengqing Gongkai Shuomingshu, 18 pp.
 CODEN: CNXXEV
 DT Patent
 LA Chinese
 FAN.CNT 1

	PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
PI	CN 1274008	A	20001122	CN 2000-102740	20000303
PRAI	CN 2000-102740		20000303		

AB The present invention relates to methods for recombinant preparation of
 Bacillus subtilis cecropin LCI in Escherichia coli. The invention also
 provides methods to construct cecropin LCI expression vector and to
 express and purify recombinant cecropin LCI protein. The bactericidal
 activity of recombinant cecropin LCI is tested to inhibit Xanthomonas
 oryzae pv. oryzae strain G. The prepared recombinant cecropin LCI can be
 used as antibacterial agents in plant breedings or bacterial fertilizer.

IT 343593-45-3P, Cecropin LCI (Bacillus subtilis)
 RL: AGR (Agricultural use); BPN (Biosynthetic preparation); PRP
 (Properties); BIOL (Biological study); PREP (Preparation); USES (Uses)
 (amino acid sequence; preparation of recombinant Bacillus subtilis
 cecropin

LCI and use as antibacterial agents in plant breedings or
 fertilization)

RN 343593-45-3 CA
 CN Cecropin LCI (Bacillus subtilis) (9CI) (CA INDEX NAME)

SEQ 1 AIKLVQSPNG NFAASFVLDG TKWIFKSKYY DSSKGYWVGI YEVWDRK

BEST AVAILABLE COPY

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/70

[12] 发明专利申请公开说明书

C07K 14/32 C12Q 1/18

C12Q 1/68 A01N 63/00

[21] 申请号 00102740.9

[43]公开日 2000 年 11 月 22 日

[11]公开号 CN 1274008A

[22]申请日 2000.3.3 [21]申请号 00102740.9

[71]申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区北京大学

[72]发明人 徐 庆 郭丽华 陈章良

[74]专利代理机构 北京大学专利事务所

代理人 孙博宁

权利要求书 5 页 说明书 8 页 附图页数 4 页

[54]发明名称 枯草芽孢杆菌杀菌肽的体外表达及其方法

[57]摘要

利用生物技术的方法,根据杀菌肽 LCI 的氨基酸序列使用植物体偏爱的密码子人工合成了 LCI 的 DNA 基因片段。构建的质粒 pBVAB16 在大肠杆菌 DH5 α 中高效表达 LCI,占大肠杆菌总蛋白量的 8.7%。大肠杆菌经离心、超声破碎、加热沉淀,以及离子交换和疏水作用液相色谱可以得到纯化的 LCI。LCI 能专门杀死水稻白叶枯病菌菌株 G,最低有效浓度为 2.5 μ g/ml。初步推断 LCI 是进入细菌体内,抑制了 RNA 的转录而引起细菌死亡。该基因可望用于植物抗病育种及特效菌肥的生产。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1、一种枯草芽孢杆菌杀菌肽的体外表达及其方法，其特征在于所述方法包括：(1) 杀菌肽 LCI 基因的化学合成及其克隆；(2) 杀菌肽 LCI 表达载体的构建；(3) 超表达的杀菌肽 LCI 的提取和纯化；(4) 杀菌肽 LCI 的抗菌活性检测；(5) 杀菌肽 LCI 对体外转录的抑制实验；(6) 杀菌肽 LCI 的序列分析。

2、根据权利要求 1. (1) 中所述的杀菌肽 LCI 基因的化学合成及其克隆，其特征在于人工合成了杀菌肽 LCI 的 DNA 基因，基因序列及其对应的氨基酸序列图如下：

Cla I start

▼ *codon* A - I - K - L - V - Q - S - P - N - G
atatcgatg gct atc aag ctg gtg cag tcc cca aac ggc
 tatagctac cga tag ttc gac cac gtc agg ggt ttg ccg

N - F - A - A - S - F - V - L - D - G
aac ttc gcc gct tcc ttc gtg ctg gac ggt
ttg aag cgg cga agg aag cac gac ctg cca

T - K - W - I - F - K - S - K - Y - Y
act aag tgg atc ttc aag tcc aaa tac tat
tga ttc acc tag aag ttc agg ttt atg ata

D - S - S - K - G - Y - W - V - G - I
gac tcc agc aag ggc tac tgg gtc ggc atc
ctg agg tcg ttc ccg atg acc cag ccg tag

Y - E - V - W - D - R - K *stop*
codon
tac gag gtg tgg gac cgc aag taagcttcg
atg ctg cac acc ctg gcg ttc attcgaagc

▲
 Hind III

3、根据权利要求 1. (2) 中所述的杀菌肽 LCI 表达载体的构建，其特征在于合成的 LCI 基因片段经 Cla I 和 Hind III 双酶切，用 T4 DNA 连接酶将它连接到经同样的这两种酶处理过的 pBluescript II KS 质粒上，经过转化大肠

杆菌 DH5 α 和筛选, 得到含有 LCI 基因的克隆质粒 pBC7, 该质粒经序列分析证实含有正确的 LCI 基因, pBC7 质粒经 Cla I 酶消化后用 DNA 多聚酶 I Klenow 大片断进行补平, 而后用 BamH I 消化, 用 2% 的琼脂糖回收 LCI 基因片段, 质粒 pBV220 经 EcoR I 消化后用 DNA 多聚酶 I Klenow 大片断进行补平, 而后用 BamH I 消化, 将 LCI 基因片段连接到 pBV220 质粒中后, 经过转化大肠杆菌 DH5 α 和筛选, 制成质粒 pBVAB16。

4、根据权利要求 1. (3) 中所述的超表达杀菌肽 LCI 的提取和纯化, 其特征在于:

含有质粒 pBVAB16 的大肠杆菌 DH5 α , 在 LB 液体培养基中活化, 其中氨苄青霉素含量为 50 mg/l, 按 1% 的接种量接入新鲜的同种培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养 2.5 小时, 而后 42 $^{\circ}$ C 诱导培养 5 小时, 转速均为 200 rpm;

诱导表达的大肠杆菌经离心 4000 rpm 10 分钟回收后, 用 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 缓冲液洗两遍, 冰浴中超声破碎 400 W 30 次, 每次 15 秒, 间隔 10 秒, 60 $^{\circ}$ C 加热 20 分钟, 10000 rpm 离心 20 分钟, 去掉沉淀, 而后经离子交换液相色谱 CM-Sephrose Fast Flow C26/20 以 0 ~ 0.6 M NaCl 线性梯度洗脱, 得到的活性色谱峰加入 4M 硫酸铵调成 2M, 加入 0.5 M, pH 6.5 的磷酸二氢钾调成 50 mM, 微虑后用疏水作用液相色谱 Phenyl-Superose HR5/5 以 1.7 ~ 0 M 硫酸铵进行线性洗脱, 得到的主峰即为纯化的 LCI, 此 LCI 样品经 PD-10 Sephadex G-25 M 脱盐后冻干, 保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用, 用 Tris-tricine SDS-PAGE 电泳确定 LCI 的纯度, LCI 的浓度由 280 nm 紫外吸收法和 Lowry 法测定, LCI 的表达量由薄层扫描仪对考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶分析确定;

由于 pBVAB16 质粒有以下特点, 使 LCI 在大肠杆菌中得到了高效的表达:

1、质粒中含有 SD 序列, 其后紧接多克隆位点, 若位于起始密码子 AUG 上游 3~11 个核苷酸处, 与 16S rRNA 的 3'端序列互补, 能促进蛋白质的高效翻译; 2、 P_R 和 P_L 两个启动子串联, 而且 P_L 受 CI 蛋白抑制, 可通过温度的变化来诱导它的表达, 从而增强了表达的稳定性和强度; 3、来自大肠杆菌的 rrB 核糖体基因的转录终止信号具有强的终止作用, 能够避免密码子的通读, 有利于质粒-宿主系统的稳定;

利用 LCI 热稳定的特性, 在 *E. coli* 中超表达的 LCI 可以从超声波破碎的

细胞悬液中抽提出来，并且用热水浴的办法使大部分蛋白质受热变形沉淀下来，从而很容易地用 CM-Sepharose Fast Flow 及 Phenyl-Superose HR5/5 或者 Mono S 液相色谱纯化得到电泳纯的 LCI，通过薄层扫描测定 LCI 的表达量为大肠杆菌总蛋白量的 8.7%，表达的 LCI 电泳表观分子量为 3.5 kDa。

5、根据权利要求 1. (4) 中所述的杀菌肽 LCI 的抗菌活性检测，其特征在于杀菌肽 LCI 的抗菌活性检测包括：

(1)、96 孔板浊度比色法确定 LCI 的抑菌比活：

用水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain G 为指示菌，将它用 LB 液体培养基过夜活化，200 rpm, 28 °C，而后取 20 μ l，加入 100 μ l 新鲜的 LB 培养基，20 μ l 不同浓度的 LCI 水溶液，即从 1.1 mg/ml LCI 开始，以二倍法稀释八次，加入 96 孔板，重复两次；无抑制对照为将 20 μ l LCI 液换成 20 μ l 无离子水，空白对照为 120 μ l LB 培养基和 20 μ l 无离子水，96 孔板于培养箱中 28 °C 培养，每隔一小时，在微量分光光度计 Microplate Autoreader EL310, BIO-TEK INSTRUMENTS 上，于 540 nm 的光线下测量每个样品孔的光密度；

由病原细菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* G 不同的生长曲线可以确定 LCI 的抑菌的最低浓度为 2.5 μ g/ml；

(2)、平板扩散法分析 LCI 的抑菌谱：

在 LB 培养基平板上，倒入 1 ml 活化的被测菌，包括 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain G，培养悬浊液，涂平，3 分钟后移去多余的液体，晾干，在平板的不同位置上分别滴加 5 μ l LCI 溶液，5 μ l 相应的缓冲液为对照，于 28 °C 过夜培养，观测抑菌圈大小，另外一种方法是将 5 μ l LCI 溶液，5 μ l 相应的缓冲液为对照先分别滴加在平板的同一条线上，待液滴消失后，用接种环蘸取活化好的菌液沿着两个液滴的位置划一直线，一个平板可以同时测定数种不同的细菌，28 °C 过夜培养，观测抑菌圈，实验发现 LCI 对 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* G 有特殊的抑制作用；

(3)、LCI 的杀菌能力测试

将过夜活化的 *X. oryzae* pv. *oryzae* strain G 用 LB 液体培养基稀释到 0.035 OD 600 nm，经微虑除菌的 LCI 样品，浓度为 0.53 mg/ml，作一次二倍稀释后，

分别以 100 μl 的量与 300 μl 的稀释菌液混合于微量离心管中，在室温下存放，每隔一定的时间，取出 20 μl 于 980 μl 的 LB 液体培养基中混匀，而后取出 100 μl 涂于 LB 琼脂板上，28 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养，通过对在平板上形成的克隆数可以确定 LCI 的杀菌能力，从图 3. 可以看出 LCI 并不是立即杀死细菌，细菌的数目在加入 LCI 后大约半小时开始下降，下降过程持续到八个小时，水稻白叶枯病菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* strain G 对 LCI 的两个浓度 0.13 mg/ml (●) 和 0.066 mg/ml (■) 都表现大概一致的敏感趋势，在高的 LCI 浓度下，该菌的存活率大约为 10^{-3} 。

6、根据权利要求 1. (5) 中所述的杀菌肽 LCI 的对体外转录的抑制实验，其特征在于：

用 Riboprobe Combination System (Promega) 和 SP6 多聚酶来测定 LCI 可能的转录抑制活性，体外转录分析在 20 μl 的反应体系中含有：40 mM Tris-HCl, pH7.5, 6 mM MgCl_2 , 2 mM 亚精胺, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 500 μM each ATP, GTP, CTP and UTP, 40 U Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor, 0.5 μg pGEM Express Positive Control Template, 20 U SP6 多聚酶，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 80 分钟，在不同的反应中加入不同量的 LCI，反应产物经 1% 琼脂糖，含 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溴化乙锭，电泳后，于 254 nm 的紫外光下观测 RNA 的合成量。

7、根据权利要求 1. (5) 中所述的杀菌肽 LCI 的序列分析，其特征在于：

对 LCI 的序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网点用 BLAST 软件在 "nr" 数据库里进行了搜索，结果没有发现相似的多肽或基因；LCI 的二级结构通过 GCG 软件用 Chou-Fasman (CF) 和 Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR) 两种方法分析确定，LCI 的计算分子量为 5595.12 Da，它的计算等电点 $\text{pI}=10.25$ ；如图 5 所示，根据预测的二级结构和与其它细菌素氨基酸序列的对比可以发现，在 LCI 的 N 端到第 23 位的色氨酸的肽段中可能含有一个 β sheet 的结构，而在此色氨酸之后到肽链的 C 端可能形成一个能够跨越质膜的双亲结构，有如细菌素 piscicocins V1，细菌素中肽段结构的互补作用对于它的活性十分重要，就象 lactococcin G, plantaricin A 和 plantaricin S 的活性要求它的 alpha 与 beta 链协同作用一样；

杀菌肽 LCI 的一级结构与许多其它种类的细菌素有三处相同之处，其中还包括羊毛硫抗生素；第一、第二类细菌素的保守序列 YGNGV 在 LCI 中结构不

全，在相同的位置它只有 NG；参考肽链中色氨酸的位置，可以发现第十位的甘氨酸是十分保守的，如图 5 的方框所示，它在许多细菌素中都是如此，如 lactacin F 和 lactacin 481 等等；第二、细菌素中色氨酸的残基数含量从 1 个到 4 个不等，大多数含有 2 至 3 个，但是它们的分布却是规律性的，尽管并不是十分严谨；在细菌素 divercin V41 中的任何一个色氨酸经过 N-溴琥珀酰胺化会使细菌素失去活性，因此推测 LCI 中的 3 个色氨酸对其杀菌活性同样起着重要的功能；第三、LCI 肽链中的第 28 到 30 位的 KYV 结构在细菌素 enterocin I 也存在，在细菌素 enterocin L50B 中则含有类似的结构 KFY，KYV 及其类似结构在其它一些细菌素中也有，只是不在肽链的中部，而是在 N 端区域，同时在此位置代替 KYV 结构的是异亮氨酸残基；

根据这些特征，推断 LCI 与乳酸菌中第二类细菌素的 pediocin 家族的细菌素最为相似，它们是 curvacin A, divercin V41, enterocin I, enterocin L50B, pediocin PA-1 和 sakacin P。

说明书

枯草芽孢杆菌杀菌肽的体外表达及其方法

本发明枯草芽孢杆菌杀菌肽的体外表达及其方法属于现代生物技术领域。

现有技术：

早在1960年以前，人们就对微生物的拮抗作用进行了广泛的生理生化研究，对各类拮抗物质进行了分门别类，对医药学的发展作出很大贡献。近年来人们对从乳酸杆菌中分离得到的肽类抗生素的作用机制和分子遗传学研究扩展的非常广泛和深入（综述文章有Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 39-86. 和 Jack, R. W., Tagg, J. R. & Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 59, 171-200.）。因为它们同其它的抗生素不同之处在于它们几乎不会引起微生物的抗药性，比如乳酸链球菌肽(nisin)作为食品的防腐剂已有五十年的历史，但是并没发现有腐败菌产生抗性的现象。因此肽类抗生素将在今后的食品业和医药业拥有巨大应用前景(Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H. G. & de Kruijff, B. (1999). Use of the Cell Wall Precursor Lipid II by a Pore-Forming Peptide Antibiotic. *Science* 287, 2361-2364.）。

杀菌肽LCI是我们实验室从枯草芽孢杆菌A014的培养液中分离出的碱性多肽，分子量为5.4 kDa。它对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain G.) 水稻条斑病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* S2) 马铃薯青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum* P01) 烟草青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum* T62, T64) 和辣椒青枯病菌 (*Pseudomonas solanacearum* PE1) 有明显的抑制作用。其全部氨基酸序列为：

AIKLVQSPNG NFAASFVLDG TKWIFKSKYY DSSKGYWVGI YEVDWRK

通过对国际基因及蛋白质数据库 (Genbank 和Swiss-port) 的检索，没有发现与此杀菌肽序列结构相似的蛋白或基因。该结果已发表 (刘进元，陈章良，抗菌多肽LCI的一级结构，自然科学进展，1994，4 (3): 365—367)。

枯草芽孢杆菌拮抗性广，拮抗物质变化多样。我们国内近些年来对枯草芽孢杆菌的抗菌蛋白的研究也时有报道，在分子生物学方面的研究尚不深入（比如辛玉成，秦淑莲，金静，张迎春，徐坤，苹果霉心病生防菌株抗菌蛋白的提纯与部分性质初报，莱阳农学院学报，1999，16（1）。孙建，枯草芽孢杆菌B-903菌株抗生物物质对植物病原真菌的抑制作用，植物病理学报，1995，25（1）：69～72）。

发明的目的

在广泛的研究利用植物、动物和昆虫来源的抗植物病原菌和病虫害基因进行农作物抗病育种，并取得许多成果的同时，研究来源于拮抗微生物的抗病基因并应用于植物基因工程目前还比较少。

本实验室在 1990 年以来就已从大田中分离出数种拮抗能力强的枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*），并分离纯化出数种对植物病原真菌和病原细菌的体外生长有抑制作用的多肽和蛋白质。进一步克隆出这些抗病基因，利用它们不同的作用机理而产生的可能的协同作用，将其同时导入植物，有希望使转基因植物即获得广谱抗菌能力又对单一病原菌的抗性增强。具有广谱抗菌，对人畜无毒的肽类抗生素同样可以用于基于生物基因工程的食物与医药产业。

分离和纯化特异的抗菌类多肽，对它们进行生理生化特性以及结构和功能的研究分析，主要是拮抗机理的阐明，这在植物基因工程和植物病理学领域具有重要的理论和应用价值。阐明多肽的结构与功能在很大程度上要依赖于该多肽基因的克隆和体外的表达，从而为克隆出该多肽的其它相关基因、研究基因的表达与调控提供分子生物学基础，同时为获得转基因抗菌农作物打下了物质基础。

发明的内容及方案

1. 按照已有的 LCI 氨基酸序列合成其基因。
2. 将 LCI 基因克隆到中间载体 pBC7。
3. 将 LCI 基因克隆到表达载体 pBVAB16。
4. LCI 杀菌肽在大肠杆菌中的诱导表达。
5. 表达的 LCI 的分离纯化。
6. 表达的 LCI 的杀菌活性检测。

7. 表达的 LCI 对体外转录的抑制作用。

优点及效果

将重组表达载体 pBV AB16 转入大肠杆菌 DH5 α 中, 经 42 °C 高温诱导, 在 5 小时 LCI 的表达量达到最高, 经对电泳凝胶的扫描分析, LCI 的表达量占大肠杆菌的总蛋白含量 8.7%。

杀菌肽 LCI 是胞外释放的质粒编码的核糖体合成的肽链, 具有低分子量、带正电荷和热稳定性。

纯化的 LCI 能专门杀死水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌株 G, LCI 最低有效浓度为 2.5 $\mu\text{g/ml}$, 该菌的在 0.13 mg/ml 的 LCI 处理下存活率为 10^{-3} 。

LCI 含有同其它细菌素相似的保守的序列结构, 它们主要是乳酸菌的第二类细菌素。根据推测的 LCI 的二级结构以及 LCI 的体外转录抑制活性, 可以初步推断 LCI 是进入细菌体内, 抑制了 RNA 的转录活动而引起细菌死亡。不同于其它细菌素只能杀死革兰氏阳性菌, LCI 能杀死革兰氏阴性菌的这个特征将大大有利于核糖体合成的细菌素在基因工程抗病育种的应用, 该基因可望首先应用于植物抗病育种及特效菌肥的生产。

附图说明

图 1. LCI 基因序列及其对应的氨基酸序列。A: 丙氨酸, I: 异亮氨酸, K: 赖氨酸, L: 亮氨酸, V: 缬氨酸, Q: 谷氨酰胺, S: 丝氨酸, P: 脯氨酸, N: 天冬酰胺, G: 甘氨酸, F: 苯丙氨酸, D: 天冬氨酸, T: 苏氨酸, W: 色氨酸, Y: 酪氨酸, E: 谷氨酸, R: 精氨酸。下划线的区域为化学合成的片段。

图 2. LCI 在不同浓度下对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌株 G 生长的抑制作用。LCI 的浓度为 0 $\mu\text{g/ml}$ (●); 0.6 $\mu\text{g/ml}$ (○); 2.5 $\mu\text{g/ml}$ (△); 4.9 $\mu\text{g/ml}$ (▲); 9.8 $\mu\text{g/ml}$ (■)。

图 3. LCI 对水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 菌株 G 杀死能力的测定。LCI 的两个浓度为 0.13 mg/ml (●) 和 0.066 mg/ml (■)。

图 4. LCI 不同浓度对体外转录的影响。LCI 的浓度: 第 1 道为不加 LCI

的对照, 第 2 道 0.11 mg/ml, 第 3 道 0.22 mg/ml, 第 4 道 0.39 mg/ml。

图 5. LCI 的二级结构以及与其它细菌素多肽序列的比较。图中的方框、下划线、阴影和黑体都代表保守区域。CF : Chou-Fasman; GOR: Garnier-Osguthorpe-Robson。

实施例

1、LCI 基因的化学合成及其克隆

杀菌肽 LCI 产生于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) A014 的培养液。它总共由 47 个氨基酸组成, 含有 6 个赖氨酸、1 个精氨酸和 3 个色氨酸。根据 LCI 的氨基酸序列, 使用植物体偏爱的密码子, 加上起始和终止密码子以及 ClaI 和 Hind III 两个酶切位点, 人工合成了 LCI 的 DNA 基因片段(见图 1.)。四个加下划线的核酸片段是用 DNA 合成仪 ABI381A (LKB)以固相亚磷酰胺法合成的:

1. 5'atatcgatggctatcaagctggtgcagtcacccaaacggcaacttcgccgct 3'
2. 5'acttgaagatccacttagtaccgtccagcacgaaggaagcggcgaagttgc 3'
3. 5'taagtggatcttcaagtcacaaatactatgactccagcaagggctactgggt 3'
4. 5'cgaagcttacttgcggtccacacctcgtagatgccgacccagtagccctt 3'

每个片断含有 51 个核苷酸残基。它们是用含有 8M 尿素的 16%的丙烯酰胺凝胶电泳纯化的。含有 DNA 片断的胶段浸入 0.5 M NaCl 溶液中过夜, 而后上清液经 DEAE-Sephrose 进一步纯化, 脱盐、冷冻干燥。每个 DNA 片断以 200 pmol 等量混合后在水浴中 85 °C 加热 5 分钟, 而后渐渐冷却到室温。再加入 dNTP 和 T4 DNA 多聚酶, 在 37 °C 进行填平反应。

2、LCI 表达载体的构建

合成的 LCI 基因片段经 Cla I 和 Hind III 双酶切, 用 T4 DNA 连接酶将它连接到经同样的这两种酶处理过的 pBluescript II KS 质粒上, 经过转化大肠杆菌 DH5 α 和筛选, 得到含有 LCI 基因的克隆质粒 pBC7。该质粒经序列分析证实含有正确的 LCI 基因。

pBC7 质粒经 Cla I 酶消化后用 DNA 多聚酶 I Klenow 大片断进行补平, 而后用 BamH I 消化, 用 2%的琼脂糖回收 LCI 基因片段。质粒 pBV220 经 EcoR

I 消化后用 DNA 多聚酶 I Klenow 大片断进行补平，而后用 BamH I 消化。将 LCI 基因片段连接到 pBV220 质粒中后，经过转化大肠杆菌 DH5 α 和筛选，制成质粒 pBVAB16。

3. 超表达的 LCI 的提取和纯化

含有质粒 pBVAB16 的大肠杆菌 DH5 α ，在 LB 液体培养基中活化，其中氨苄青霉素含量为 50 mg/1，按 1% 的接种量接入新鲜的同种培养基中，30℃ 培养 2.5 小时，而后 42℃ 诱导培养 5 小时，转速均为 200 rpm。

诱导表达的大肠杆菌经离心 4000 rpm 10 分钟回收后，用 50 mM Tris-HCl, pH 7.8 缓冲液洗两遍，冰浴中超声破碎 400 W 30 次，每次 15 秒，间隔 10 秒，60℃ 加热 20 分钟，10000 rpm 离心 20 分钟，去掉沉淀。而后经离子交换液相色谱 CM-Sepharose Fast Flow C26/20 以 0 ~ 0.6 M NaCl 线性梯度洗脱。得到的活性色谱峰加入 4M 硫酸铵调成 2M，加入 0.5 M, pH 6.5 的磷酸二氢钾调成 50 mM，微虑后用疏水作用液相色谱 Phenyl-Superose HR5/5 以 1.7 ~ 0 M 硫酸铵进行线性洗脱，得到的主峰即为纯化的 LCI。此 LCI 样品经 PD-10 Sephadex G-25 M (Pharmacia) 脱盐后冻干，保存于 -20℃ 备用。用 Tris-tricine SDS-PAGE 电泳确定 LCI 的纯度。LCI 的浓度由 280 nm 紫外吸收法和 Lowry 法测定。LCI 的表达量由薄层扫描仪对考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶分析确定。

由于 pBV AB16 质粒有以下特点，使 LCI 在大肠杆菌中得到了高效的表达：

1、质粒中含有 SD 序列，其后紧接多克隆位点，若位于起始密码子 AUG 上游 3~11 个核苷酸处，与 16s rRNA 的 3' 端序列互补，能促进蛋白质的高效翻译；2、 P_R 和 P_L 两个启动子串联，而且 P_L 受 CI 蛋白抑制，可通过温度的变化来诱导它的表达，从而增强了表达的稳定性和强度；3、来自大肠杆菌的 rrB 核糖体基因的转录终止信号具有强的终止作用，能够避免密码子的通读，有利于质粒-宿主系统的稳定。

利用 LCI 热稳定的特性，在 *E. coli* 中超表达的 LCI 可以从超声波破碎的细胞悬液中抽提出来，并且用热水浴的办法使大部分蛋白质受热变形沉淀下来，从而很容易地用 CM-Sepharose Fast Flow 及 Phenyl-Superose HR5/5 或者 Mono S 液相色谱纯化得到电泳纯的 LCI。通过薄层扫描测定 LCI 的表达量为大肠杆菌总蛋白量的 8.7%。表达的 LCI 电泳表观分子量为 3.5 kDa。

应该指出的是，经离心去除的细胞碎片和 60℃ 热处理产生的沉淀中都有抑菌活性，也就是说，有相当一部分 LCI 没有被回收。若这些沉淀用缓冲液再冲洗两次，合并洗涤液，有希望提高得率。

4. LCI 的抗菌活性检测

1、96 孔板浊度比色法确定 LCI 的抑菌比活：

用水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain G)为指示菌，将它用 LB 液体培养基过夜活化(200rpm, 28℃)后，取 20μl，加入 100μl 新鲜的 LB 培养基，20 μl 不同浓度的 LCI 水溶液（从 1.1 mg/ml LCI 开始，以二倍法稀释八次），加入 96 孔板，重复两次。无抑制对照为将 20 μl LCI 液换成 20 μl 无离子水，空白对照为 120 μl LB 培养基和 20 μl 无离子水。96 孔板于培养箱中 28 °C 培养。每隔一小时，在微量分光光度计(Microplate Autoreader EL310, BIO-TEK INSTRUMENTS)上，于 540 nm 的光线下测量每个样品孔的光密度。

由病原细菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* G 不同的生长曲线可以确定 LCI 的抑菌的最低浓度为 2.5 μg/ml（见图 2.）。

2、平板扩散法分析 LCI 的抑菌谱：

在 LB 培养基平板上，倒入 1 ml 活化的被测菌(包括 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain G)培养悬浊液，涂平，3 分钟后移去多余的液体，晾干。在平板的不同位置上分别滴加 5 μl LCI 溶液，5 μl 相应的缓冲液为对照，于 28 °C 过夜培养，观测抑菌圈大小。另外一种方法是将 5 μl LCI 溶液，5 μl 相应的缓冲液为对照先分别滴加在平板的同一条线上，待液滴消失后，用接种环蘸取活化好的菌液沿着两个液滴的位置划一直线。一个平板可以同时测定数种不同的细菌。28 °C 过夜培养，观测抑菌圈。实验发现 LCI 对 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* G 有特殊的抑制作用。

3、LCI 的杀菌能力测试

将过夜活化的 *X. oryzae* pv. *oryzae* strain G 用 LB 液体培养基稀释到 0.035 OD 600 nm。经微虑除菌的 LCI 样品（0.53 mg/ml）作一次二倍稀释后，分别以 100 μl 的量与 300 μl 的稀释菌液混合与微量离心管中，在室温下存放。每隔一定的时间，取出 20 μl 于 980 μl 的 LB 液体培养基中混匀，而后取出 100 μl 涂于

LB 琼脂板上, 28 °C 过夜培养。通过对在平板上形成的克隆数可以确定 LCI 的杀菌能力。从图 3. 可以看出 LCI 并不是立即杀死细菌, 细菌的数目在加入 LCI 后大约半小时开始下降, 下降过程持续到八个小时。水稻白叶枯病菌 (*X. oryzae* pv. *oryzae* strain G) 对 LCI 的两个浓度 0.13 mg/ml (●) 和 0.066 mg/ml (■) 都表现大概一致的敏感趋势, 在高的 LCI 浓度下, 该菌的存活率大约为 10^{-3} 。

在大肠杆菌中表达的 LCI 可能没有转录后的修饰, 但是天然的 LCI 则有可能, 而且这种修饰往往会赋予杀菌肽更多的活性特征。另外现在还很难说明增加在 N 端的蛋氨酸是否会影响 LCI 的杀菌特性。

水稻白叶枯病菌 *X. oryzae* pv. *oryzae* G 是革兰氏阴性菌, 而在通常条件下革兰氏阳性菌产生的细菌素只对革兰氏阳性菌有作用。目前已知的植物病原细菌大都是革兰氏阴性菌, 因此 LCI 能杀死革兰氏阴性菌的这个特征将大大有利于核糖体合成的细菌素在基因工程抗病育种的应用。

5. LCI 对体外转录的抑制实验

用 Riboprobe Combination System (Promega) 和 SP6 多聚酶来测定 LCI 可能的转录抑制活性。体外转录分析在 20 μ l 的反应体系中含有: 40 mM Tris-HCl, pH7.5, 6 mM $MgCl_2$, 2 mM 亚精胺, 10 mM NaCl, 10 mM DTT, 500 μ M each ATP, GTP, CTP and UTP, 40 U Recombinant RNasin Ribonuclease inhibitor, 0.5 μ g pGEM Express Positive Control Template, 20 U SP6 多聚酶, 在 37 °C 反应 80 分钟。在不同的反应中加入不同量的 LCI。反应产物经 1% 琼脂糖 (含 0.5 μ g/ml 溴化乙锭) 电泳后, 于 254 nm 的紫外光下观测 RNA 的合成量。如图 4 所示, LCI 的三个不同浓度: 第 2 道 0.11 mg/ml, 第 3 道 0.22 mg/ml 和第 4 道 0.39 mg/ml 相对于不加 LCI 的对照 (第 1 道) 都表现出对 RNA 合成的影响, 而且在 0.39 mg/ml 浓度时, RNA 的合成几乎全被抑制。

6. LCI 的序列分析

对 LCI 的序列通过 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网点用 BLAST 软件在 "nr" 数据库里进行了搜索, 结果没有发现相似的多肽或基因。LCI 的二级结构通过 GCG 软件用 Chou-Fasman (CF) 和 Garnier-Osguthorpe-Robson (GOR) 两种方法分析确定。LCI 的计算分子量为 5595.12 Da 它的计算等电点 $pI=10.25$ 。如图 5 所示, 根据预测的二级结构和与其它细菌素氨基酸序列的对比可以发现, 在 LCI

的 N 端到第 23 位的色氨酸的肽段中可能含有一个 β sheet 的结构, 而在此色氨酸之后到肽链的 C 端可能形成一个能够跨越质膜的双亲结构, 有如细菌素 piscicocins V1。细菌素中肽段结构的互补作用对于它的活性十分重要, 就象 lactococcin G, plantaricin A 和 plantaricin S 的活性要求它的 alpha 与 beta 链协同作用一样。

杀菌肽 LCI 的一级结构与许多其它种类的细菌素有三处相同之处, 其中还包括羊毛硫抗生素。第一、第二类细菌素的保守序列 YGNGV 在 LCI 中结构不全, 在相同的位置它只有 NG。参考肽链中色氨酸的位置, 可以发现第十位的甘氨酸是十分保守的, 如图 5 的方框所示。它在许多细菌素中都是如此, 如 lactacin F 和 lacticin 481 等等。第二、细菌素中色氨酸的残基数含量从 1 个到 4 个不等, 大多数含有 2 至 3 个, 但是它们的分布却是规律性的, 尽管并不是十分严谨。在细菌素 divercin V41 中的任何一个色氨酸经过 N-溴琥珀酰胺化会使细菌素失去活性, 因此推测 LCI 中的 3 个色氨酸对其杀菌活性同样起着重要的功能。第三、LCI 肽链中的第 28 到 30 位的 KYY 结构在细菌素 enterocin I (enterocin L50A) 也存在, 在细菌素 enterocin L50B 则含有类似的结构 KFY。KYY 及其类似结构在其它一些细菌素中也有, 只是不在肽链的中部, 而是在 N 端区域, 同时在此位置代替 KYY 结构的是异亮氨酸残基。

根据这些特征, 推断 LCI 与乳酸菌中第二类细菌素的 pediocin 家族的细菌素最为相似, 它们是 curvacin A (sakacin A), divercin V41, enterocin I (L50A), enterocin L50B, pediocin PA-1 (AcH) 和 sakacin P。

说明书附图

Cla I start

▼ *codon* A - I - K - L - V - Q - S - P - N - G
~~atatcgatg gct atc aag ctg gtg cag tcc cca aac ggc~~
~~tatagctac cga tag ttc gac cac gtc agg ggt ttg ccg~~

N - F - A - A - S - F - V - L - D - G
~~aac ttc gcc gct tcc ttc gtg ctg gac ggt~~
~~ttg aag cgg cga agg aag cac gac ctg cca~~

T - K - W - I - F - K - S - K - Y - Y
~~act aag tgg atc ttc aag tcc aaa tac tat~~
~~tga ttc acc tag aag ttc agg ttt atg ata~~

D - S - S - K - G - Y - W - V - G - I
~~gac tcc agc aag ggc tac tgg gtc ggc atc~~
~~ctg agg tcg ttc ccg atg acc cag ccg tag~~

Y - E - V - W - D - R - K *stop*
codon
~~tac gag gtg tgg gac cgc aag taagcttcg~~
~~atg ctc cac acc ctg gcg ttc attcgaagc~~

▲
Hind III

图 1.

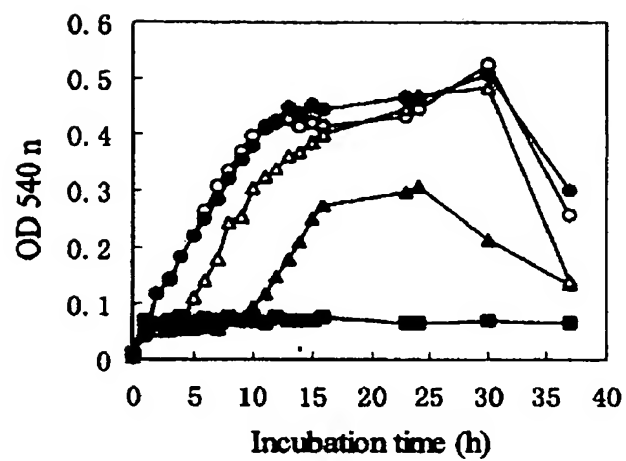


图 2.

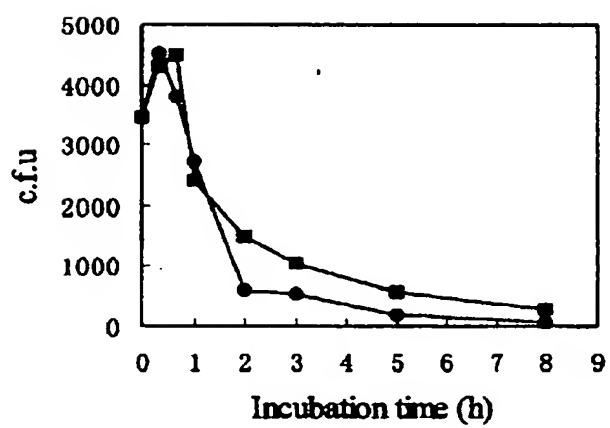


图 3.

00:00:00

BEST AVAILABLE COPY

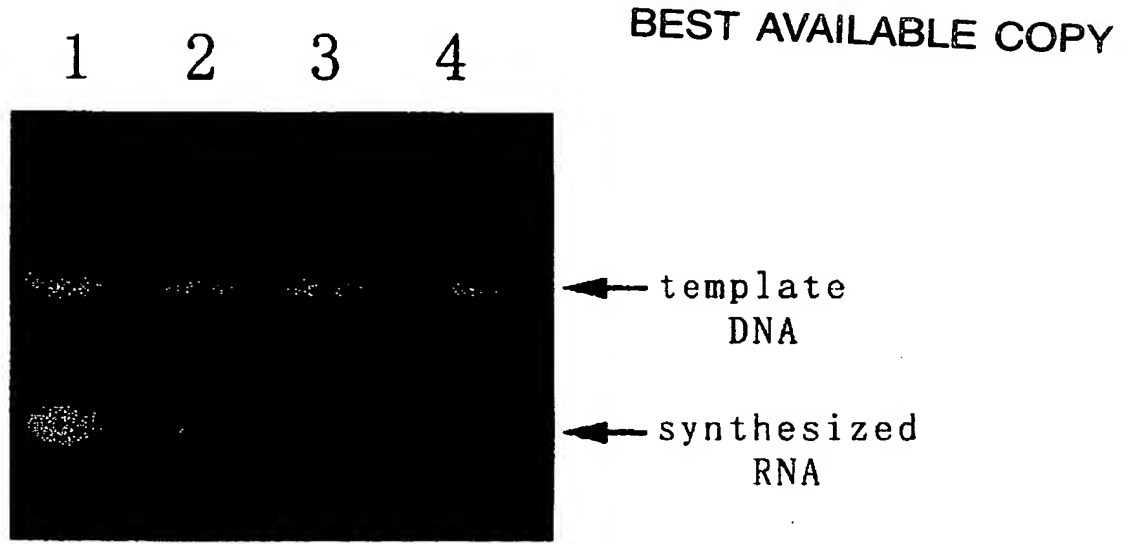


图 4.

细菌素	序列	氨基酸数
	1 5 10 15 20 25 30 35 40 47	
二级结构	BBBBBB.TTTTHHHHHHHttBBBBB..TtttTTTBBBBBBhhhhhh	按CF预测
二级结构	BBBBBB.....BBBBB..TTTT.TTTTTTTTTTTBBBBBB.TTTT	按GOR预测
LCI	AIKLVSFNGNFAASFVLDGTKNIFKSKYYDSSKGYEVGIYEVDRK	47
Acidocin A	KTYXGTNGVHCTKKSLSLGGKVLKNVIPGTLCKRQSLPIKQDLKILLGNATGAFGKTFH	58
Acidocin 8912	KTHYPTNARKSLKGFHESLRYTDGF	27
Bacteriocin 31	TNVEAATYYGNGLYCNKQKCVDFNKASREIGKIIVNGIVQHGPIAPR	48
Bavaricin A	KYYGNGVHXGKHSXTVDNGTAIGNIGNNAAANXATGXNAGG	41
Bavaricin MN	TKYYGNGVYCNSKKCVDFGQAAGGIGQTVVKGLGGAIPGK	42
Carnobacteriocin A(Piscicolin 61)	DQMSDGVNYGKGSLSKGGAKCGLGIVGGLATIPSGPLGNLAGAAGVINSCKM	53
Carnobacteriocin B2	VNYGNGVSCSKTKCSVNGQAQFQERYTAGINSFVSGVASGAGSIGRRP	48
Carnobacteriocin BM1(B1)	AISYGNGVYCNEKCKVNKAENKQAITGIVIGGNASSLAGMGH	43
Colicin V	ASGRDIAMAIGTSLGQFVAGGIGAAAGG	
	VAGGAIYDYASTHKPNPAMSPSGLGGTIKQKPEGIPSEANFYAAGRLCNPSNNLSDVCL	88
Curvacin A (Sakacin A)	ARSYGNGVYCENKKCVNNGEATQSIIGGMISGHASGLAGM	41
Divercin V41	TKYYGNGVYCNSKKCVDFGQASGCIGQTVVGGGLGGAIPGKC	43
Enterocin A	TTHSGKYYGNGVYCTKNKCTVDNAKATTCTIAGMSIGGFLGGAIPGKC	47
Enterocin B	ENDHRMPNELNRPNNSLKGGAACGAAIAGGLFGIPKGPLAFAAGLANVYSKCN	53
Enterocin I (L50A)	MGAIKLVAKFGPIVKKYYKQIMQFIGEGHAINKIIEYIKKHI	44
Enterocin L50B	MGAIKLVTKFGPIPLIKKYYKQIMQFIGOGHTIDQIEKTLKRH	43
Lactacin F Lafa	RNNQTNVCGAVGSAMIGATVGGTICGPACAVAGAHYLPILFTGVTAATGGFGKIRK	57
Lactacin F LafX	NRNGDTVLSAASGAGTGKAKCKSFGP NGAICGVGGAAGGYFGYTHN	48
Lactacin 481(lactococcin DR)	KGGSGVIHTISHECNMNSNQFVFTCCS	27
Lactococcin A	KLTFIQSTAAGDLYYNTNTHKYYVQQTQNAFGAAANTIVNGHMGGAAGGFLHH	54
Lactococcin B	SLOXVMSAGPYTYKDRTRGKTICKQTIIDTASYTFGVMAEGFKTFH	47
Lactococcin G, alpha	GTRDDIGQGIGRVAYWVGKAMGNMSDVNQASRINRKKKH	39
Lactococcin G, beta	RKNGILAVDPAYEFIKGFGKAIKEGNKDKKNI	35
Lactococcin M	IRGTGKGLAAAMVSGAAMGGAIGAFGGPVGAIMGAGGAVGGAMKYSI	48
Lactobin A (A-UAL 187)	NRNTNAYSAAALGCAVFGVKYGKKLGGVNGAVIGGVGGAAVCGLAGYVRKG	50
Leucocin A (B-TA11a)	KYYGNGVHCTKSGCSVNGEAFSAGVHRLANGGNGFW	37
Leucocin C-TA33a	KNYGNGVHCTKSGCSVDNGYAATNIANNVNMGLTG	36
Mesentericin Y105 (52A)	KYYGNGVHCTKSGCSVNGEASAGIHLANGGNGFW	37
Mesentericin B105 (52B)	XGVLCNLSMASSALTGPQFPNSPFLAKIKNBK	32
Mundticin	KYYGNGVSCNKKGCSVDNGKAIGIIGNNSAANLATGGAAGWSK	43
Pediocin PA-1 (AcH)	KYYGNGVTCGKHSCSVDNGKATTCTIINNAMAATGQHGNHCK	44
Piscicocin V1a	KYYGNGVSCNKGCTVDNSKAIGIIGNNAAANLTGGAAGGNKG	44
Piscicolin 126	KYYGNGVSCNKGCTVDNSKAIGIIGNNAAANLTGGAAGGNKG	44
Plantaricin A beta(alpha)	(A)YSLQMGATAIKQVKKLFKKNGW	23
Plantaricin S alpha	RNKLAYNMGHYAGKATIFGLAAWALLA	27
plantaricin S beta	KKKKQSHYAAAGDAIVSPGEGFLNAW	26
Sakacin P	KYYGNGVHCGKHSCTVDNGTAIGNIGNNAAANATGGNAGGNK	43

图 5.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.